

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 35/76	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64024 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01711 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Juni 1999 (08.06.99) (30) Prioritätsdaten: 198 25 620.5 8. Juni 1998 (08.06.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); In Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VON KNEBEL-DOEBERITZ, Magnus [DE/DE]; Rainweg 93, D-69118 Heidelberg (DE). KLEIN-BAUERNSCHMITT, Petra [DE/DE]; Klingenweg 1, D-69118 Heidelberg (DE). ZUR HAUSEN, Harald [DE/DE]; Eichenstrasse 1, D-69483 Waldmichelbach (DE). SCHLEHOFER, Jörg [DE/DE]; Feilgasse 14, D-69181 Leimen (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: USE OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES FOR DECREASING THE RADIOTHERAPY-INDUCED OR CHEMOTHERAPY-INDUCED RESISTANCE IN CANCER PATIENTS (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ADENOASSOZIIERTEN VIREN ZUR SENKUNG DER RADIO- ODER CHEMOTHERAPIEINDUZIERTEN RESISTENZ BEI KREBSPATIENTEN (57) Abstract <p>The invention relates to the use of adeno-associated viruses for decreasing the radiotherapy-induced or chemotherapy-induced resistance in patients who suffer from a cancer which is to be treated by radiotherapy or chemotherapy.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Krebspatienten

Die Erfindung betrifft die Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden.

Die Therapie maligner Erkrankungen erfolgte bisher neben der chirurgischen Entfernung von Tumoren durch Radio- und/oder Chemotherapie. Der Einsatz zytostatischer Agentien wird jedoch durch das Auftreten von Nebenwirkungen, insbesondere durch die Ausbildung von Resistenzen, limitiert. Bedingt durch diese Nebenwirkungen können Chemotherapeutika nur in begrenztem Umfang eingesetzt werden. So kann nicht mehr als eine vom Patienten tolerierbare Dosierung des Chemotherapeutikums eingesetzt werden, die aber in den meisten Fällen nur einen geringen kurativen Effekt erzielt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, das Problem der durch Radio- oder Chemotherapie induzierten Resistenz zu vermindern bzw. abzuschwächen. Dadurch soll die Überlebensrate von Krebspatienten nach einer Radio- oder Chemotherapie verbessert werden. Ferner sollen die Folgedosen bei einer Radio- oder Chemotherapie gesenkt werden können. Weiterhin soll die Ansprechbarkeit von Tumorzellen auf Radio- oder Chemotherapie verbessert werden.

Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß wird durch die Verwendung von adenoassoziierten Viren die Ausbeildung einer radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden,

gesenkt.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß nach einer Behandlung mit humanen apathogenen adenoassoziierten Viren (AAV) die Tumorzellen besser auf eine nachfolgende chemo- oder radiotherapeutische Maßnahme ansprechen.

Das AAV-Virus ist ein humanes Parvovirus, das eine Koinfektion mit einem Helfervirus benötigt, damit eine produktive Infektion stattfinden kann. AAV infiziert Menschen in früher Kindheit und gilt als apathogen, da keine menschliche Krankheit mit der AAV-Infektion verbunden werden konnte (Adv. in Vir. Res. 1987, 32, 43-306).

Eine Infektion mit AAV in Kombination mit chemo- oder radiotherapeutischen Maßnahmen steigert nach Erkenntnis der Erfinder die Effizienz der herkömmlichen Therapie und vermindert auftretende Resistenzen, so daß eine weitere Therapie erfolgversprechender als bisher durchgeführt werden kann. Erfindungsgemäß können beliebige AAV-Viren verwendet werden. Bevorzugt wird das AAV-2-Virus verwendet.

In Tierversuchen mit immundefizienten Nacktmäusen, denen subkutan kleinzellige Bronchialkarzinomzellen implantiert wurden, konnte gezeigt werden, daß eine AAV-Infektion, die gleichzeitig mit einer chemotherapeutischen Behandlung vorgenommen wurde, zu einem schnelleren Rückgang der Tumoren führte. In beiden Gruppen zeigten sich nach kurzer Zeit Rezidive. Diese sprachen jedoch in der AAV-infizierten chemotherapierten Gruppe auf eine erneute Chemotherapie besser an als in der nur chemotherapierten Gruppe. Daraus läßt sich erkennen, daß eine Infektion mit AAV die Ausbildung von Resistenzen vermindert oder sogar vermeidet.

Die erfindungsgemäße Verwendung der AAV-Viren kann vor, gleichzeitig oder nach der chemo- oder radiotherapeutischen Behandlung erfolgen. Sie erfolgt jedoch bevorzugt nach einem ersten chemo- oder radiotherapeutischen Behandlungszyklus.

Insbesondere bei Tumorarten, die per se schlecht auf eine chemo- oder radiotherapeutische Behandlung ansprechen, kann es angezeigt sein, die Behandlung vor der oder begleitend zu der Chemo-/Radiotherapie durchzuführen, um die Effizienz der Behandlung zu erhöhen. Dadurch können die Behandlungsdosen gesenkt werden, wodurch die Nebenwirkungen vermindert werden können.

Die Radio- oder Chemotherapie kann eine beliebige Radio- oder Chemotherapie sein, die dem zu behandelnden Krebs angepaßt ist. Solche Therapien sind seit Jahren bekannt und neben der chirurgischen Entfernung des Tumors die etablierte Methode, um Krebserkrankungen zu heilen bzw. die Lebenserwartung eines Patienten um einige Zeit zu erhöhen. Dem Fachmann sind deshalb die Maßnahmen einer Radio- oder Chemotherapie bestens bekannt.

Die erfindungsgemäße Verwendung der AAV-Viren kann auf beliebige Krebsarten wie angewendet werden, wobei beste Erfolge bei Colon-, Pankreas- und Hirntumoren (insbesondere Glioblastom) zu erwarten sind. Bevorzugt ist das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) damit behandelbar.

Die erfindungsgemäße Verwendung erfolgt intravenös, per infusionem, intratumoral, oral (auch per inhalationem) oder kutan. Dabei wird das Virus in einem geeigneten, dem Verabreichungsweg angepaßten Präparat formuliert. So ist es bevorzugt für eine intravenöse (auch als Infusion) und intratumorale Verabreichung das Virus in einer physiologischen Kochsalzlösung, Ringerlösung oder PBS-Lösung (Phosphatgepufferte Salzlösung), für eine kutane Verabreichung in Form einer Salbe, Suspension oder Gel, für eine orale Verabreichung in Form von Aerosolspray bereitzustellen.

Die verwendete Virusdosis beträgt abhängig vom Körpergewicht des Patienten 10^9 - 10^{10} AAV-Partikel/kg KG.

Erfindungsgemäß wird auch eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, die neben dem Chemotherapeutikum

(Zytostatikum) adeno-assoziierte Viren, insbesondere AAV-2, enthält. Als Chemotherapeutikum sind alle bisher in der Tumorthherapie gebräuchlichen Chemotherapeutika (Zytostatika) einzeln oder in Kombination einsetzbar, beispielsweise Cis-Platin, Etoposid, Methothrexat, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Trofosfamid, Busulfan, Cytarabin, Fluoruracil, Mercaptopurin, Vinblastinsulfat, Vincristinsulfat, Bleomycinsulfat oder Mitomycin. So ist es bevorzugt für eine intravenöse (auch per infusionem) und intratumorale Verabreichung eine Injektionslösung, für eine kutane Verabreichung in Form einer Salbe, für eine orale Verabreichung in Form von Aerosolspray bereitzustellen. Als Basis für die Bereitung der Infusionslösung eignen sich jeweils in reiner Form oder als Mischung physiologische Kochsalzlösung, Ringerlösung oder PBS. Die Menge an AAV richtet sich nach dem Gewicht des Patienten und beträgt 10^9 - 10^{10} Partikel/kg KG. In der pharmazeutischen Zusammensetzung ist diese in einer Menge für ein mittleres Körpergewicht von 70 kg enthalten. Die genaue Dosierung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung wird vom Arzt festgelegt und ist abhängig vom Geschlecht und Gewicht des Patienten, Schwere der Krankheit, Art der Verabreichung und geplanter Dauer der Verabreichung. Eine erfindungsgemäße Zusammensetzung kann auch übliche Hilfsstoffe enthalten. Als Hilfsstoffe können die üblichen, wie Arzneimittelträger, Bindemittel, Sprengmittel, Gleitmittel, Lösungsmittel, Lösungsvermittler, Freigabe-Beschleuniger, Freigabe-Verzögerer, Emulgatoren, Stabilisatoren, Färbemittel der Geschmackskorngenzen verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der beigefügten Figuren näher erläutert.

Figur 1 zeigt eine schematische Darstellung des zur Bestimmung von AAV-2 vermittelter Arzneimittel-sensibilisierung verwendete Protokoll. Die Proliferation der SCLC-Zelllinien nach der Infektion und/oder Arzneimittelbehandlung wurde mit dem MTT-Assay (J. Immunol. Methods 1983, 56, S. 55-63) bestimmt. Die relative Proliferation (A/Ao) wurde durch das Verhältnis der

Absorption von AAV-2-infizierten und/oder mit dem Arzneimittel behandelten Zellen (A) zu der Absorption von pseudoinfizierten, unbehandelten Zellen (Ao) berechnet.

Die Figuren 2a+b zeigen die AAV-vermittelte Sensibilisierung der SCLC-Zelllinien gegenüber Cis-Platin, die relative Proliferation (A/Ao) der SCLC-Zelllinien, NCI-H209 (Figur 2a) und NCI-H446 (Figur 2b) nach Pseudoinfektion (a: PBS allein; b: infiziert mit einem hitzeinaktivierten Gradienten von Ad2-infizierten Zellen) oder Infektion mit verschiedenen Multiplizitäten einer Infektion mit AAV-2 mit (graue Säulen) oder ohne (weiße Säulen) anschließende Behandlung mit IC50 von Cisplatin gemäß Tabelle 1 (TCID, in der Gewebekultur infektiöse Dosis).

Die Figur 3 zeigt die AAV-vermittelte Sensibilisierung von von NCI-H209-Zellen abgeleiteten Tumoren in Nacktmäusen (5 Mäuse pro Gruppe). Die Dosis an Cis-Platin war 3 mg/kg Körpergewicht (wöchentliche Verabreichung). Die Etoposid-Dosis betrug 7,5 mg/kg Körpergewicht (dreimal wöchentlich verabreicht). AAV-2 wurde in einer MOI von 10^8 TCID/Tier wöchentlich verabreicht. Pfeile zeigen die Änderung der Behandlungsmodalitäten an: - Unterbrechung der Arzneistoffbehandlung und AAV-2-Infektion; + Beginn der Behandlung und der Infektion.

Die Erfindung wird am Beispiel des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) näher erläutert. Dieser Karzinomtyp ist im allgemeinen durch eine anfänglich effektive Chemotherapie und Remission des Tumors gekennzeichnet. Jedoch erleiden fast alle Patienten ein Rezidiv, das durch eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber der zuerst angewendeten Chemotherapie entstanden ist (üblicherweise Cisplatin/Etoposid). Daher wurde in einem Modellsystem mit einer menschlichen kleinzelligen-Lungenkarzinom-Zelllinie getestet, ob eine Infektion mit AAV die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika in der Zellkultur und in Tumoren bei immungestörten Mäusen verstärkt. Es wird gezeigt, daß die Infektion mit AAV signifikant die Wirksamkeit der chemotherapeutischen Behandlung an SCLC-Tumorzellen und -Tumoren erhöht.

Beispiel 1

Sensibilisierung von SCLC-Zelllinien gegenüber Cis-Platin und Etoposid durch AAV-Infektion

Kleinzellige Lungenkrebszelllinien (NCI-H69, NCI-H164, NCI-H209 und NCI-H446) (Cancer Res., 1980, 40, 3502-3507; Cancer Res., 1985, 45, 2913-2923) wurden in RPMI-1640-Medium (Eurobio, Raunheim, Deutschland) gezüchtet. HeLa-Zellen wurden in DMEN (Eurobio, Raunheim, Deutschland) gezüchtet. Alle Wachstumsmedien wurden mit Glutamin (Eurobio, 1%), Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) und 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (PAA, Linz, Österreich) supplementiert. Die Kulturen wurden bei 37°C in einer Feuchtatmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert und regelmäßig auf Mycoplasmenverunreinigungen getestet.

Das adeno-assoziierte Virus Typ 2 (AAV-2) wurde in HeLa-Zellen unter Verwendung von Adenovirus Typ 2 (Ad-2) als Helfer vermehrt. AAV wurde in einem Cäsium-chloridgradienten gereinigt und wie in J. Gen. Virol., 1994, 74, 2655-2662 beschrieben titriert. Die Adenovirus Typ 2 Inokula waren geklärte Überstände von Ad2-infizierten HeLa-Zellen.

Die SCLC-Zellen wurden in PBS suspendiert und mit gereinigtem AAV-2 in den angegebenen Multiplizitäten der Infektion (MOI) inkubiert. Nach 45 min bei 37°C wurde nichtgebundenes, absorbiertes Virus durch Waschen mit PBS entfernt und das Wachstumsmedium wurde ergänzt. Als Kontrollen (Pseudoinfektion) wurden entweder PBS oder die hitzeinaktivierte Fraktion (56°C, 30 min.) eines CsCl-Gradienten von mit Ad-2 infizierten Zellen alleine verwendet, wobei die Dichte (1,14 g/cm³) der AAV-2-haltigen Fraktion, die bei der AAV-2-Reinigung verwendet wurde, in den jeweiligen Experimenten angegeben ist. Das Volumen/Zell-Verhältnis bei diesen Experimenten war 50mal größer (5ml/10⁶ Zellen) als das, das für die AAV-Infektionen verwendet wurde.

Die AAV-2- oder pseudoinfizierten Zellen wurden mit Cis-Platin

(Astra Medica, Frankfurt/Main, Deutschland) oder Etoposid (Bristol, München, Deutschland) oder beiden in einem Verhältnis [Cisplatin: Etoposide = 1:2,5] behandelt, wobei die Arzneistoffe aufgelöst in PBS dem Medium in der angegebenen Konzentration zugesetzt wurde.

Die Proliferation der SCLC-Zellen nach der Infektion mit AAV-2 und/oder Behandlung mit Chemotherapeutika wurde durch den modifizierten MTT-Test bestimmt (J. Immunol. Methods, 1983, 56, 55-63). Nach der Infektion oder Pseudoinfektion wurden die Zellen in Platten mit 24 Kavitäten in einer Dichte von 10^5 Zellen/Kavität ausgebracht und mit den Chemotherapeutika in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach sechs Tagen (NCI-H69, NCI-H446) bzw. acht Tagen (NCI-H146, NCI-H209) wurde der Kultur MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt. Die Kulturen wurden dann 4 h bei 37°C inkubiert, um eine Reduktion von MTT zu blauem Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen (Arch. Biochem. Biophys., 1993, 303, 474-482) zu erlauben, was eine aktive Proliferation der Zellen anzeigt. Die Zellen wurden zentrifugiert, mit PBS gewaschen und Formazan wurde in Isopropanol solubilisiert. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (1000 UpM, 15 min) pelletiert und 200 µl-Proben des Überstands wurden gemessen, um die optische Dichte bei 540 nm (OD540) zu bestimmen, wobei die OD690 als Referenz und ein Titertek Multiskan plus MKII-Densitometer verwendet wurden (Lab Systems, Finnland).

Die relative Proliferation (A/Ao) wurde als das Verhältnis der in dem Überstand von AAV-2-infizierten und/oder mit Arzneistoff behandelten Zellen gemessene Absorption (A), verglichen mit der Absorption, die für den Überstand der pseudoinfizierten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen gemessen wurde (Ao) definiert. Der IC50-Wert wurde als die Arzneistoff-Konzentrationen, die zu einer 50%-igen Hemmung der Proliferation führten, definiert.

Die mit AAV-2 infizierten Zellen (MOI-Werte wie angegeben) oder pseudoinfizierten Zellen wurden in Platten mit 24 Kavitäten ausgebracht und mit Cisplatin behandelt. Nach sechs bzw. acht Tagen wurde die relative Proliferation bestimmt. Zusätzlich wurden kinetische Studien durchgeführt, um die optimalen Behandlungsmodalitäten für SCLC-Zellen nach einer AAV-Infektion zu bestimmen. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die AAV-vermittelte Sensibilisierung eine bis drei Stunden nach der Infektion maximal war. Bei dieser Untersuchung wurden die Chemotherapeutika drei Stunden nach der AAV-Infektion verabreicht. Um Effekte, die auf nach der Reinigung mit dem CsCl-Gradienten und der Ad2-Hitzeinaktivierung noch vorhandene Faktoren zurückzuführen sind, auszuschließen, wurde eine Kontrolle der Pseudoinfektion mit PBS zusätzlich zu der Pseudoinfektion mit der Fraktion des jeweiligen Gradienten eines Zellysats von mit Ad2 infizierten Zellen durchgeführt.

Es wurde die relative Proliferation von NCI-H209- und NCI-H446-SCLC-Zellen nach der Infektion mit verschiedenen Vielfachen der infektiösen Einheiten (MOI) von AAV-2 (10^1 - 10^5 in der Gewebekultur infektiöse Dosis (TCID) pro Zelle) mit und ohne anschließende Behandlung mit Cisplatin bei den in Tabelle 1 aufgeführten IC50-Werten gemessen.

Tabelle 1

Konzentration der Chemotherapeutika, die zu einer 50%-igen Hemmung der Proliferation (IC50) der SCLC-Zelllinien führen

NCI-H69	0,2	0,26	0,08/0,2
NCI-H146	0,11	0,025	0,008/0,02
NCI-H209	0,007	0,053	0,006/0,015
NCI-H446	0,15	0,21	0,042/0,105

Wie in Tabelle 1 gezeigt, zeigten die SCLC-Zelllinien NCI-H69 und NCI-H446 eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber beiden Arzneimitteln, wobei die Empfindlichkeit gegenüber der Cisplatin/Etoposide-Behandlung niedriger war, wohingegen NCI-H146-Zellen gegenüber Etoposide hoch empfindlich waren und die NCI-H209-Zellen gegenüber beiden Arzneistoffen hoch empfindlich waren.

Wie aus Figur 2 (a+b) hervorgeht, führte die AAV-2-Infektion zu einer Abnahme der Proliferationsrate der mit Cisplatin behandelten Zellen bei einer MOI von 10^3 bis 10^4 TCID/Zelle. Die Infektion mit einer MOI von 10^5 TCID/Zelle führte zu keiner weiteren Verstärkung. Keine signifikante Hemmung der Proliferation wurde nach der Infektion mit niedrigeren MOI-Werten von AAV-2 oder nach der Pseudoinfektion beobachtet, was eine spezifische Wirkung infolge der Infektion mit hoher MOI von AAV-2 anzeigt. Die relative Proliferation in AAV-2 infizierten (10^{3-5} AAV/Zelle) und mit Cisplatin behandelten (IC50) Zellen wurde auf 0,29 in NCI-H446-Zellen und auf 0,25 in NCI-H209-Zellen verglichen mit der relativen Proliferation in nur mit Cisplatin behandelten (IC50) Zellen (0,59 in NCI-H446-Zellen und 0,5 in NCI-H209-Zellen) erniedrigt.

Beispiel 2

Quantitative Bestimmung der AAV-2-vermittelten Arzneistoffsensibilisierung von SCLC-Zelllinien

Um die Sensibilisierung von Zellen gegenüber Chemotherapeutika nach Infektion mit AAV-2 quantitativ zu bestimmen, wurden Dosis-Antwort-Kurven aufgestellt. Es wurde die relative Proliferation der Zelllinien nach einer Pseudoinfektion (PBS) oder AAV-Infektion mit 10^3 oder 10^4 TCID/Zelle und anschließende Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin oder Etoposide oder eine Kombination beider Arzneimittel bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2

Sensibilisierungsfaktor von SCLC-Zelllinien, die mit Cisplatin und/oder Etoposide behandelt und mit AAV infiziert wurden.

Zelllinie	Chemotherapeutikum	Sensibilisierungsfaktor (A/Ao)* 10 ⁴ Ip. AAV/Zelle
NCI-H69	Cisplatin	1,43
	Etoposide	1,30
	Cisplatin/Etoposide	1,45
NCI-H146	Cisplatin	1,37
	Etoposide	1,38
	Cisplatin/Etoposide	1,33
NCI-H209	Cisplatin	2,33
	Etoposide	2,12
	Cisplatin/Etoposide	2,00
NCI-H446	Cisplatin	2,50
	Etoposide	3,00
	Cisplatin/Etoposide	3,00

*Die relative Proliferation (A/Ao) wurde durch das Verhältnis der Absorption von mit AAV-2-infizierten und/oder mit Arzneistoff behandelten (A) Zellen zu der Absorption der pseudoinfizierten, unbehandelten Kontrollen (Ao) berechnet

Die Sensibilisierungsfaktoren (SF) wurden als das Verhältnis der IC50-Werte infizierter Zellen verglichen mit den IC50-Werten pseudoinfizierter Zellen definiert. Der Sensibilisierungsfaktor gibt den Faktor an, um den die Konzentration eines Chemotherapeutikums nach Infektion mit AAV-2 erniedrigt werden kann, um den gleichen Grad an Proliferationshemmung zu erhalten. Wie in Tabelle 2 zusammengefaßt war die Sensibilisierung

durch AAV-2 in NCI-H69 und NCI-H146 mäßig (maximaler SF etwa 1,4 bei einer MOI von 10^4 TCID/Zellen). Die Infektion von NCI-H209 oder NCI-H446 induzierte eine signifikantere MOI-abhängige Sensibilisierung (maximaler SF etwa 3 (NCI-H446) und 2,3 (NCI-H209) bei einer MOI von 10^4 TCID/Zelle). Die AAV-2 vermittelte Sensibilisierung hing von dem verwendeten Chemotherapeutikum nicht ab.

Beispiel 3

AAV-2-vermittelte Arzneistoffsensibilisierung von NCI-H209-abgeleiteten Tumoren in Nacktmäusen

H209 ist eine Zelllinie, die von einem Tumor abgeleitet ist, der vor der Züchtung nicht chemotherapeutisch behandelt wurde und nicht arzneimittelresistent ist.

Weibliche Nacktmäuse (CD1-nu/nu) von Iffa Credo (Brüssel, Belgien) wurden in Isolatoren gehalten und erhielten Wasser und Nahrung nach Belieben. Experimentell wachsende SCLC-Zellen (H209) wurden subcutan den sechs Wochen alten Mäusen (10^7 Zellen in 100 μ l PBS pro Tier) in die Flanke injiziert. Fünf Monate nach der Inokulation der Zellen, als die Tumore ein Durchschnittsvolumen von 200 mm³ erreicht hatten, wurden die Tiere wöchentlich mit AAV-2 (intratumorale Injektion von 10^8 in der Gewebekultur infektiösen Dosen (TCID)) infiziert und/oder mit Chemotherapeutica durch intraperitoneale Injektion von 3 mg/kg Körpergewicht Cis-Platin (wöchentlich) und 7,5 mg/kg Körpergewicht Etoposid (dreimal wöchentlich) behandelt. Einzelheiten des Beginns und des Endes der Behandlung sind in Figur 3 angegeben. In jeder Gruppe (Kontrolle, chemotherapeutische Behandlung, AAV2-Infektion, Behandlung + Infektion), wurden fünf Tiere aufgenommen. Die infizierten und nicht-infizierten Tiere wurden in separaten Isolatoren gehalten. Die Tumordurchmesser wurden wöchentlich gemessen und das Tumolvolumen wurde durch die Formel Tumolvolumen = $\frac{1}{2}$ x Breite x Tiefe x Höhe bestimmt. Das relative Tumolvolumen (V/V₀) wurde für jedes Tier und jeden Zeitpunkt bestimmt (Verhältnis des

Tumorvolumens [V] verglichen mit dem Tumor zu Beginn der Behandlung [Vo]).

Wie aus Figur 3 hervorgeht, führte die Behandlung mit Chemotherapeutika zu einer raschen Abnahme der Tumorstadien und einer vollständigen Regression nach dreiwöchiger Behandlung. Die Kombination von Chemotherapie mit AAV2-Infektion führte zu einer rascheren Abnahme der Tumorstadien verglichen mit Tieren, die nur eine Chemotherapie erhalten hatten, was eine Sensibilisierung der durch den Arzneistoff behandelten Tumorzellen durch AAV-2 anzeigt. Die Infektion mit AAV-2 alleine hatte keine signifikante Wirkung, und die Tumorstadien nahmen in gleichem Umfang wie bei den unbehandelten Kontrollen zu. Die Behandlung wurde nach vollständiger Regression der Tumore unterbrochen und wurde bei einem Rezidiv wieder aufgenommen. Die Behandlung von Rezidiven war bei Tieren, die nur eine Arzneimittelbehandlung erhalten hatten weniger effektiv, verglichen mit der bei AAV-infizierten und chemotherapeutisch behandelten Tiere. Dies zeigt die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der anfänglichen Behandlung bei mindestens der chemotherapeutisch behandelten Tiergruppe an. Die Rezidive in mit AAV-2 behandelten Tieren waren weiterhin gegenüber der Behandlung mit Cis-Platin und Etoposid empfindlich, aber die Tumorstadien waren langsamer verglichen mit der Regression der anfänglichen Tumore. In Woche 9 bildeten sich bei 3 von 5 mit AAV-2 infizierten Tieren die Tumore vollständig zurück, im Gegensatz zu den Tumoren bei Tieren, die nur mit Chemotherapeutika behandelt wurden, wobei eine vollständige Regression der Tumore nicht induziert wurde.

PATENTANSPRÜCHE

- 1) Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden.
- 2) Verwendung nach Anspruch 1, wobei die adenoassoziierten Viren in einer Dosis von 10^9 - 10^{10} AAV-Partikel/kg KG eingesetzt werden.
- 3) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei das adenoassoziierte Virus adenoassoziiertes Virus 2 (AAV-2) ist.
- 4) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs ein Colon-, Pankreas- oder Hirntumor oder kleinzelliges Lungenkarzinom ist.
- 5) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Verwendung intravenös, kutan, oral oder intratumoral erfolgt.
- 6) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Verwendung vor, nach oder gleichzeitig zu einer Chemo- oder Radiotherapie erfolgt.
- 7) Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein Chemotherapeutikum und adenoassoziierte Viren.
- 8) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Chemotherapeutikum Cis-Platin und/oder Etoposid ist.
- 9) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, wobei diese eine Injektions- oder Infusionslösung, ein Aerosolspray oder eine Salbe ist.



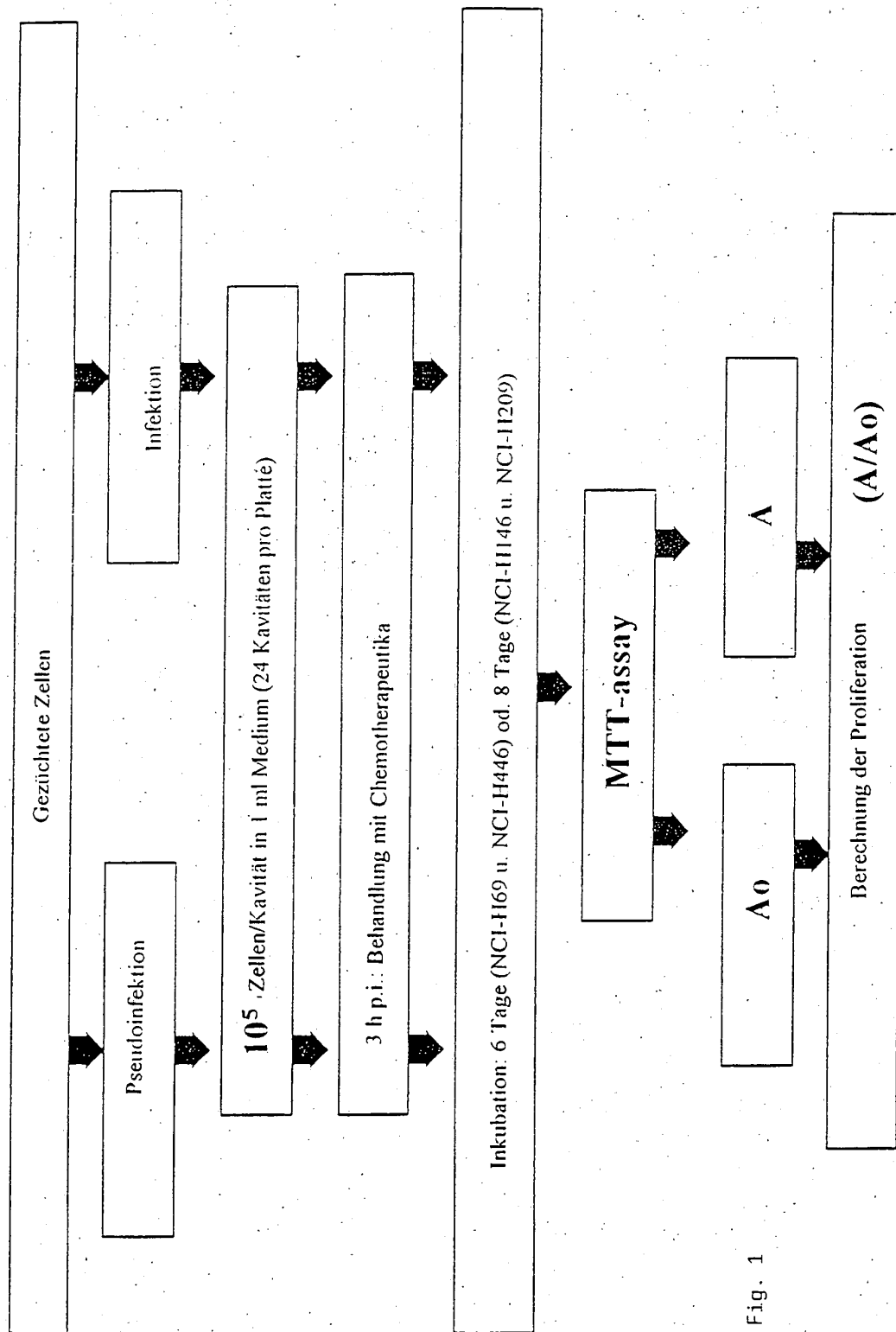


Fig. 1

NCI-H209

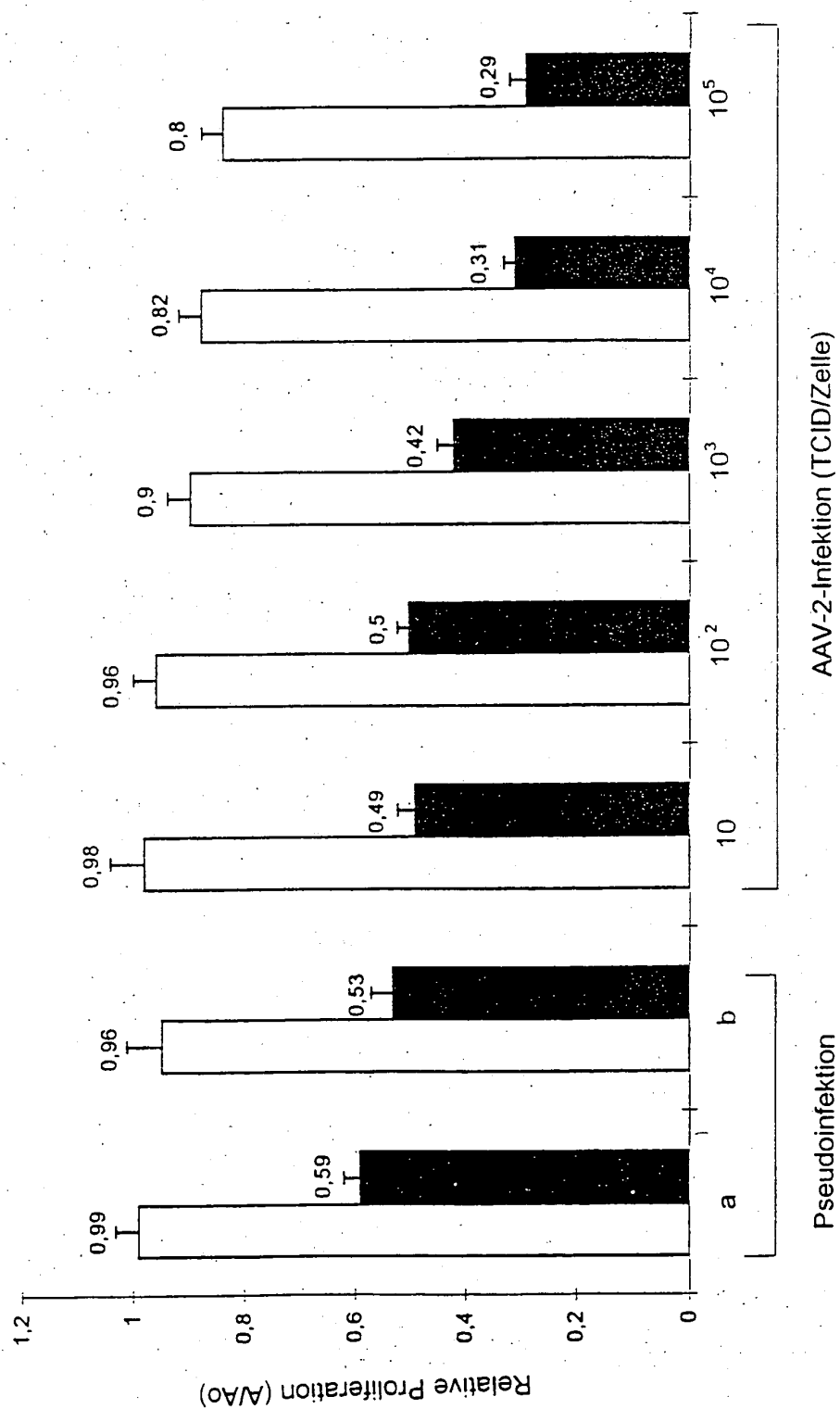


Fig. 2a

NCI-H446

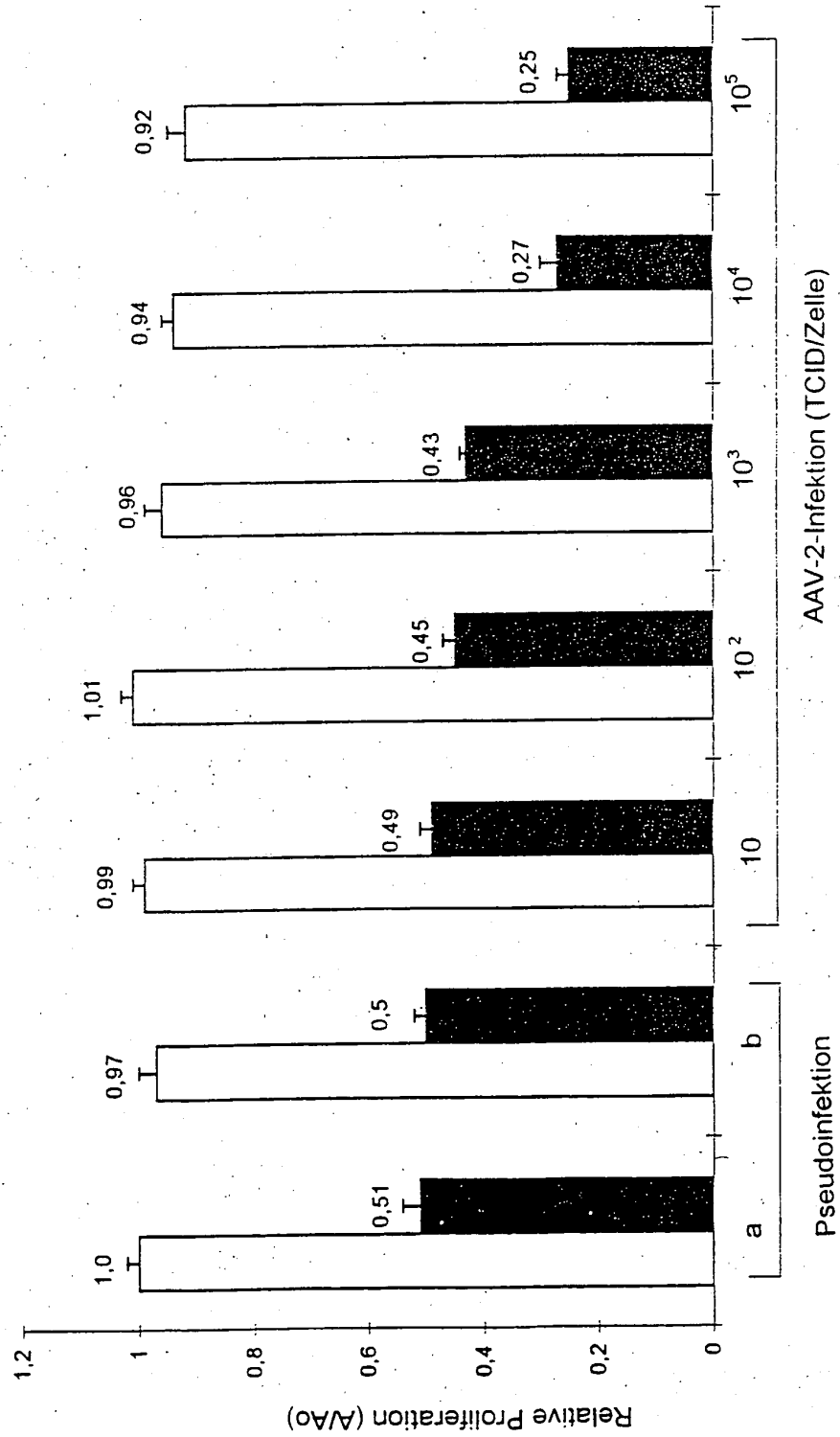


Fig. 2b

4/4

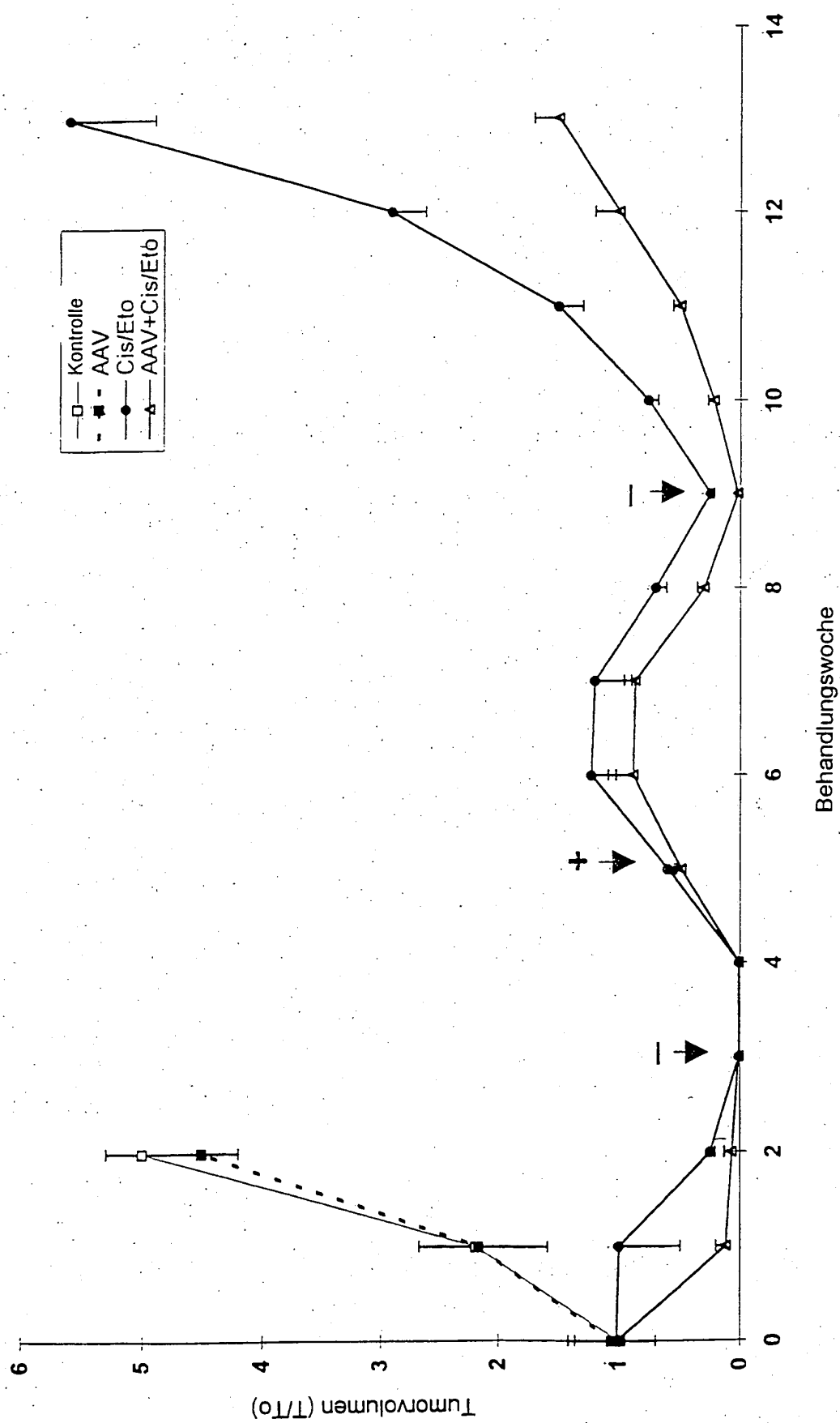


Fig. 3

mt

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGEN
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K 35/76		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64024
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	16. Dezember 1999 (16.12.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01711		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 8. Juni 1999 (08.06.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 25 620.5 8. Juni 1998 (08.06.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; In Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 9. März 2000 (09.03.00)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VON KNEBEL-DOEBERITZ; Magnus [DE/DE]; Rainweg 93, D-69118 Heidelberg (DE). KLEIN-BAUERNSCHMITT, Petra [DE/DE]; Klingenweg 1, D-69118 Heidelberg (DE). ZUR HAUSEN, Harald [DE/DE]; Eichenstrasse 1, D-69483 Waldmichelbach (DE). SCHLEHOFER, Jörg [DE/DE]; Feilgasse 14, D-69181 Leimen (DE).			
(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			
(54) Title: USE OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES FOR DECREASING THE RADIOTHERAPY-INDUCED OR CHEMOTHERAPY-INDUCED RESISTANCE IN CANCER PATIENTS			
(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ADENOASSOZIIERTEN VIREN ZUR SENKUNG DER RADIO- ODER CHEMOTHERAPIEINDUZIERTEN RESISTENZ BEI KREBSPATIENTEN			
(57) Abstract			
The invention relates to the use of adeno-associated viruses for decreasing the radiotherapy-induced or chemotherapy-induced resistance in patients who suffer from a cancer which is to be treated by radiotherapy or chemotherapy.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft die Verwendung von adenoassoziierten Viren zur Senkung der radio- oder chemotherapieinduzierten Resistenz bei Patienten, die an einem durch Radio- oder Chemotherapie zu behandelnden Krebs leiden.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

CT/DE 99/01711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K35/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KLEIN-BAUERNSCHMITT P ET AL: "Improved efficacy of chemotherapy by parvovirus-mediated sensitisation of human tumour cells." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, (1996 SEP) 32A (10) 1774-80. , XP000867207	7-9
A	page 1774, column 1, paragraph 1 - paragraph 2 page 1775, column 2, paragraph 5 page 1777, column 2, paragraph 4	1-6
X	WO 96 18737 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;BUERKLE ALEXANDER (DE); ZUR HAUSEN HARALD () 20 June 1996 (1996-06-20)	7,9
A	page 1, paragraph 1 -page 2, paragraph 1; claims 1-3,8 page 3, paragraph 3 page 3, paragraph 6	1

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 January 2000

Date of mailing of the international search report

27/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Charles, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

T/DE 99/01711

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>HILLGENBERG M ET AL: "Enhanced sensitivity of small cell lung cancer cell lines to cisplatin and etoposide after infection with adeno-associated virus type 2."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, (1999 JAN) 35 (1) 106-10. , XP000867208</p> <p>page 106, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 1</p> <p>page 107, column 2, paragraph 4</p> <p>page 109, column 2, paragraph 2</p> <p>page 110, column 1, paragraph 3</p> <p>-----</p>	7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/01711

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9618737 A	20-06-1996	DE 4444949 C	21-11-1996
		EP 0871742 A	21-10-1998
		JP 10510160 T	06-10-1998
<hr/>			



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ern ales Aktenzeichen

CT/DE 99/01711

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K35/76

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KLEIN-BAUERNSCHMITT P ET AL: "Improved efficacy of chemotherapy by parvovirus-mediated sensitisation of human tumour cells." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, (1996 SEP) 32A (10) 1774-80. , XP000867207	7-9
A	Seite 1774, Spalte 1, Absatz 1 - Absatz 2 Seite 1775, Spalte 2, Absatz 5 Seite 1777, Spalte 2, Absatz 4	1-6
X	WO 96 18737 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;BUERKLE ALEXANDER (DE); ZUR HAUSEN HARALD () 20. Juni 1996 (1996-06-20)	7,9
A	Seite 1, Absatz 1 -Seite 2, Absatz 1; Ansprüche 1-3,8 Seite 3, Absatz 3 Seite 3, Absatz 6	1

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Januar 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Charles, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

T/DE 99/01711

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	<p>HILLGENBERG M ET AL: "Enhanced sensitivity of small cell lung cancer cell lines to cisplatin and etoposide after infection with adeno-associated virus type 2."</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, (1999 JAN) 35 (1) 106-10., XP000867208</p> <p>Seite 106, Spalte 1, Absatz 1 - Spalte 2, Absatz 1</p> <p>Seite 107, Spalte 2, Absatz 4</p> <p>Seite 109, Spalte 2, Absatz 2</p> <p>Seite 110, Spalte 1, Absatz 3</p> <p>-----</p>	7-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung und zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01711

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9618737 A	20-06-1996	DE 4444949 C	21-11-1996
		EP 0871742 A	21-10-1998
		JP 10510160 T	06-10-1998
<hr/>			

